

국내산 포도 캠벨종의 종자 및 과피 추출물의 Free Radical 소거능 탐색

박성진 · 이현용 · 오덕환[†]

강원대학교 바이오산업공학부

Free Radical Scavenging Effect of Seed and Skin Extracts from Campbell Early Grape (*Vitis labruscana* B.)

Sung Jin Park, Hyeon-Yong Lee and Deog Hwan Oh[†]

School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, ChunChon 200-701, Korea

Abstract

This study was conducted to determine optimal extraction condition and free radical scavenging effect of ethanol extracts of Campell Early grape seeds and skins at different temperatures, and of organic solvent fractionated from ethanol extracts of grape seeds and skins. The free radical scavenging effect was tested using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) method and expressed as dose required for a 50% reduction of DPPH radical (RC₅₀). The extraction yields were increased with increasing the extraction temperature but it was not related with ethanol concentrations. The ethanol extract of grape seeds obtained at 50°C showed the more stronger RC₅₀ (16.8 µg/mL) than those of both 30°C and 78°C. The ethylacetate fraction obtained from ethanol extract of grape seed showed the strongest RC₅₀ (15.4 µg/mL). Overall, both ethanol extracts and their fractions of grape seeds showed significantly stronger free radical scavenging effect than those of skin extracts.

Key words: grape seed, grape skin, free radical scavenging effect

서 론

포도(*Grape/Vitis vinifera*)는 갈매나무목(Rhamnales) 포도과(Vitaceae)에 속하는 낙엽성 덩굴식물로 11속 약 700여종이 있으며, 현재 우리나라에서 가장 많이 재배되고 있는 품종은 미국종(*Vitis labruscana* B.)이다. Campbell early종은 미국 오하이오주에서 Campbell씨가 moore early에 (belvidere × muscat hamburg)를 교배하여 육성한 품종으로 1892년에 선발 명명한 품종이며 우리나라에는 1908년에 도입되었다(1). 미네랄이 풍부한 포도는 알카리성 식품으로 전화당, 주석산, 구연산, 칼륨 및 철분 등을 비롯하여 비타민 A, B₁, B₂, D 등으로 영양이 풍부하여 피로회복, 피부미용, 소화불량, 식욕부진에 좋은 효과를 나타내며 이노 작용과 함께 병에 대한 저항력을 키워주는 효과들이 알려져 있다. 이러한 포도는 음료 및 주류 가공 등의 원료와 식용으로 오랫동안 이용되어 왔으나 종자에 대한 이용방안의 거의 없었다. 특히 포도 종자는 풍부한 (+)-catechin 등의 폴리페놀 화합물을 함유하고 있는데, 포도 전체의 폴리페놀 화합물의 존재 비율은 과육에 2~5%, 과피에 25~50%, 그리고 종자에 50~70%가 존재하며 이러한 폴리페놀들은 혈관에서 흡수되어 항산화 효과, free radical 소거능 및 항암성과 같은 효과를 나타낸다(2-6).

더욱이 경제 성장과 평균 수명의 연장과 함께 현대인들의 질병과 고령화 사회에 따른 삶의 질의 대한 인식이 변하고 있으며 그에 따른 항균, 항산화, 항암 및 면역 강화 활성 등의 생리활성을 갖는 천연 물질에 대한 관심이 높아가고 있다(7-9). 특히 여러 식물에 다양한 형태로 존재하는 폴리페놀 화합물은 phenolic hydroxyl 그룹으로 인하여 효소 단백질 같은 거대분자들과 결합하는 성질이 있어 항균 및 항산화 활성 등을 나타낸다. 또한 활성 산소(free radical)가 모든 질병의 원인 물질로 알려지면서 활성 산소(free radical)를 효과적으로 제어할 수 있는 천연 free radical 소거 물질에 대한 관심이 증대되었고, 그에 따른 연구가 활발히 진행되었다(10,11).

본 연구에서는 폴리페놀 화합물이 다량 함유되어 있는 캠벨종 포도의 종자와 과피의 추출 조건과 그에 따른 DPPH법에 의한 free radical 소거능에 대한 활성을 비교하여 최적의 추출 조건의 확립과 항산화 활성을 살펴봄으로써 캠벨종 포도의 종자와 과피의 천연 항산화제로서의 가치를 확인하여 보았다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용된 포도 캠벨종의 종자와 과피는 춘천 지역의

[†]Corresponding author. E-mail: deoghwa@kangwon.ac.kr
Phone: 82-33-250-6457. Fax: 82-33-250-6457

포도 재배 농가에서 재배된 것으로 각 부위별로 나누어 건조한 후 분쇄하여 보관하면서 사용하였다.

추출 및 분획

가장 높은 추출 수율을 나타내는 조건을 찾기 위하여 캠벨 종의 종자와 과피는 erlenmeyer flask와 water bath(SWB-10, Korea)를 이용하여 분말시료에 시료중량의 10배량의 ethanol을 농도별(100%, 70%, 50%)로 가하여 각 온도별(78°C, 50°C, 30°C)로 12시간동안 2회 반복 추출한 다음 감압 여과 장치로 여과한 후, rotary vacuum evaporator(EYELA N-N-SERIES, Japan)를 사용하여 농축하고 이를 동결 건조하였다. 각 조건의 ethanol 추출물을 극성이 다른 용매를 이용하여 단계적으로 분획하였다. 즉, ethanol 추출물과 hexane, 증류수 1:10:9의 비율로 혼합하여 추출 분획한 후 rotatory vacuum evaporator로 농축하여 hexane 분획물을 얻은 후 수층 분획은 분획여두에서 다시 chloroform, ethyl acetate 그리고 butanol로 체계적으로 용매분획한 다음 각각 chloroform(CHCl₃)층, ethyl acetate(EtOAc)층, butanol(BuOH)층 및 aqueous(H₂O)층 분획물을 얻어 농축하고 이를 동결건조하여 밀봉한 후 4°C의 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다. 한편, 에탄올 추출물의 수율은 분말시료 건조중량에 대한 에탄올 추출물의 동결건조량의 조성비로 나타내었고 유기용매의 추출수율은 에탄올 추출물의 동결건조 중량에 대한 각 유기용매추출물의 동결건조량의 조성비로 각각 나타내었다.

Free radical 소거능 활성

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)를 이용한 free radical 소거능 활성을 검정하기 위하여 여러 농도의 시료를 4 mL의 메탄올에 녹여 1.5×10^{-4} M DPPH 메탄올 용액 1 mL를 첨가한 후, 30분간 상온에 방치하고 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 시료의 양(μ g)을 reduction concentration(RC₅₀)으로 나타냈으며, 기존의 항산화제인 α -tocopherol과 BHA를 비교하였다.

결과 및 고찰

온도별 추출 수율

에탄올의 농도와 추출 온도를 다르게 하여 각 추출 조건에 따른 포도 종자 및 과피 에탄올 추출물의 추출량을 조사하기 위하여 12시간 2회 반복 추출한 후, 농축하여 동결 건조한 수율은 Table 1과 같다. 종자의 에탄올 추출 수율은 에탄올 농도 100%와 70%에서는 추출 온도가 증가함에 따라 수율이 증가하는 경향을 보였으나, 에탄올 농도 50%에서는 추출 온도에 따른 유의적인 경향을 보이지 아니하였으며, 과피 에탄올 추출 수율은 각 에탄올 농도 100%, 70%와 50% 모두에서 추출 온도가 증가함에 따라 수율이 증가하였다. 각 추출 조건 중 가장 높은 수율을 나타낸 것은 종자와 과피 모두 에탄올 농도 100%

Table 1. Extraction yields of grape seed and skin by various ethanol concentration and extraction temperature

Extract condition		Yields (%)		
		100% EtOH	70% EtOH	50% EtOH
Seed	78°C	11.4	8.8	10.7
	50°C	6.9	6.3	5.9
	30°C	5.3	5.7	6.5
Skin	78°C	44.5	41.0	42.0
	50°C	35.0	35.8	34.0
	30°C	26.5	31.8	28.8

와 추출 온도 78°C에서 11.4%와 44.5%를 각각 나타내었다.

각 종자와 과피 에탄올 추출물을 hexane, chloroform, ethyl acetate 그리고 butanol로 분획한 분획물들의 수율은 Table 2와 같다. 종자 추출물과 과피 추출물의 분획물 수율 역시 현저한 차이를 보였는데, hexane 분획물은 종자에서는 30.6%, 과피는 4.0%였고, chloroform분획물은 종자에서는 0.2%였으나, 과피는 3.3%였다. 또한 ethyl acetate 분획물은 종자에서는 10.0%, 과피에서는 1.4%를 나타내었으며, butanol 분획물은 종자에서는 20.0%를 과피에서는 5.7%를, 물 분획물은 종자는 39.2%를, 과피는 85.6%를 보였다.

동일한 추출 조건에서 과피 에탄올 추출물이 평균 수율 35.5%로 종자 에탄올 추출물 평균 수율 7.5%보다 현저히 높았다. 또한 각 유기 용매별 분획물 수율에서도 종자 에탄올 추출물의 각 유기 용매 분획물과 과피 에탄올 추출물의 각 유기 용매 분획물 간의 현저한 차이를 확인하였다. 특히 폴리페놀 화합물들을 많이 함유하고 있는 것으로 알려진 ethyl acetate 분획물은 과피 에탄올 추출물에서 1.4%인데 반하여 종자 에탄올 추출물에서는 10.0%를 차지하였다.

Free radical 소거능 활성

포도 캠벨종의 종자와 과피 에탄올 추출물과 분획물의 free radical 소거 활성은 DPPH법(12)에 의하여 확인하였으며, 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 시료의 양(μ g)을 RC₅₀으로 나타내었다. 종자와 과피 에탄올 추출물의 추출 온도에 따른 free radical 소거 활성에 대한 결과는 Table 3과 같다. 종자 에탄올추출물은 78°C, 50°C 및 30°C에서 각각 17.7 μ g, 16.8 μ g, 17.2 μ g의 RC₅₀를 나타내었고, 과피 에탄올 추출물은 78°C, 50°C 및 30°C에서 추출한 추출물들이 2437.5 μ g, 2569.2 μ g 및 3186.1 μ g의 RC₅₀을 나타내었다. 이같은 결과는 지질 과산화 억제효과에서도 비슷한 경향을 나타내었다. Park 등(13)은 종자 에탄올 추출물이 과피 에탄올 추출물보다 약 70%이상 높은 지질과산화물의 감소를 나타내

Table 2. The yields of organic solvent fractions from grape seed and skin ethanol extracts

Fractions	Yields (%)				
	Hexane fr.	CHCl ₃ fr.	EtOAc fr.	BuOH fr.	H ₂ O fr.
Seed	30.6	0.2	10.0	20.0	39.2
Skin	4.0	3.3	1.4	5.7	85.6

Table 3. Free radical scavenging effect of ethanol extracts of grape seeds and skins at various extraction temperature

	Sample ¹⁾	RC ₅₀ ²⁾ (µg/mL)
Seed	78°C extract	17.7
	50°C extract	16.8
	30°C extract	17.2
Skin	78°C extract	2437.5
	50°C extract	2569.2
	30°C extract	3186.1
α -tocopherol		15.4
BHA		16.9

¹⁾100% ethanol concentration was used.

²⁾Dose required for a 50% reduction of DPPH radical at 517 nm.

었다고 보고하였다.

종자와 과피 에탄올 추출물들의 분획물들에 대한 free radical 소거 활성에 대한 결과는 Table 4와 같다. 종자 에탄올 추출물의 유기 용매 분획물들의 free radical 소거 활성은 hexane 분획물, chloroform 분획물, ethyl acetate 분획물, butanol 분획물 및 물 분획물이 21.5 µg, 50.8 µg, 15.4 µg, 15.6 µg 및 38.2 µg를 나타내었다. 한편 과피 에탄올 추출물의 유기 용매 분획물들의 free radical 소거 활성은 hexane 분획물, chloroform 분획물, ethyl acetate 분획물 및 butanol 분획물이 2855.4 µg, 3906.3 µg, 881.1 µg 및 698.4 µg를 나타내었으나, 물 분획물에서는 free radical 소거 활성을 확인할 수 없었다.

최근 천연물의 여러 생리활성에 관한 연구 중 폴리페놀 화합물의 항균 및 항산화 활성 등에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구에서는 국내산 캠벨종 포도 종자 및 과피로부터 에탄올 및 유기용매의 각 농도와 추출 온도 변화에 따른 수율과 free radical 소거 활성을 각각 조사하였다. 종자 에탄올 추출물의 free radical 소거 활성은 추출 온도 조건의 변화와 상관없는 결과를 나타내었으나, 과피 에탄올 추출물의 free radical 소거 활성은 추출 온도에 비례하여 증가하였다. 특히 종자 에탄올 추출물들의 free radical 소거 활성은 α -tocopherol과 BHA와

Table 4. Free radical scavenging effect of organic solvent fractions obtained from ethanol extracts of grape seeds and skins

	Sample	RC ₅₀ ²⁾ (µg/mL)
Seed	Hexane fr.	21.5
	CHCl ₃ fr.	50.8
	EtOAc fr.	15.4
	BuOH fr.	15.6
	H ₂ O fr.	38.2
Skin	Hexane fr.	2855.4
	CHCl ₃ fr.	3906.3
	EtOAc fr.	881.1
	BuOH fr.	698.4
α -tocopherol		15.4
BHA		16.9

¹⁾Organic solvent fractions were obtained from 100% ethanol extracts.

²⁾Dose required for a 50% reduction of DPPH radical at 517 nm.

비슷한 수준으로 과피 에탄올 추출물의 free radical 소거 활성보다 145배 이상 현저히 높은 활성이며, 이러한 결과는 Hur 등(2)이 보고한 포도나무가지 추출물의 free radical 소거 활성이 RC₅₀ = 34.5 µg보다 높은 free radical 소거 활성을 나타내었다. 각 에탄올 추출물의 각 유기 용매별 분획물간의 free radical 소거 활성의 비교에서는, 종자 에탄올 추출물 중 ethyl acetate 분획물과 butanol 분획물이 α -tocopherol과 BHA보다 높은 free radical 소거 활성을 보였으며, 이는 ethyl acetate 분획물과 butanol 분획물에 함유되어 있는 폴리페놀 화합물에 기인한 것으로 사료된다. 또한 과피 에탄올 추출물의 각 유기 용매별 분획물이 종자 에탄올 추출물의 분획물에 비하여 현저히 낮은 free radical 소거 활성을 보였으나, ethyl acetate 분획물과 butanol 분획물은 다른 분획물들보다 높은 free radical 소거 활성을 보였다.

Cho 등(14)이 21종의 식용 식물 중 참취잎이 RC₅₀=20.0 µg으로 가장 높은 free radical 소거 활성을 보인 것과 비교할 때 포도 종자 에탄올 추출물의 free radical 소거 활성이 높은 것으로 나타났으며 Lee 등(15)은 포도 과피 물 추출물의 *S. aureus*, *B. subtilis* 및 *E. coli*에 대한 항균 활성 및 GTase 활성 저해 효과를 나타냈다고 보고하였다.

한편, 포도 품종별로 free radical 소거 활성은 물론 지질과산화, 항암 등 여러가지 생리활성효능이 현저하게 차이가 나는 것으로 나타났다. Park 등(16)은 거봉종 포도 종자에탄올 추출물(RC₅₀ = 409.7 µg/mL) 및 과피 에탄올 추출물(RC₅₀ = 6528.8 µg/mL)의 free radical 소거 활성이 캠벨종 포도 종자(RC₅₀ = 16.8 µg/mL) 및 과피 에탄올 추출물(RC₅₀ = 2437.5 µg/mL)보다 현저하게 저하된다고 보고하였으며 지질과산화, 항암 등 여러 가지 생리활성효과도 캠벨종이 거봉종보다 우수한 것으로 보고하였다(13).

따라서 포도 품종별에 대한 종자와 과피의 생리활성효능에 규명과 이를 활용한 각종 질병의 예방 및 치료에 필요한 기능성 식품 또는 의약품으로의 개발에 필요한 free radical 소거 활성의 주성분 물질의 분리, 구조 해석 및 기타 생리활성에 대한 추가적인 연구가 필요하다 하겠다.

요 약

본 연구는 캠벨종 포도의 종자와 과피 에탄올 추출물의 추출 조건과 그에 따른 DPPH법에 의한 free radical 소거 활성을 비교하여 최적의 추출 조건의 확립과 항산화 활성을 살펴보았다. 추출 조건은 추출 용매인 에탄올의 농도와 추출 온도를 달리 하여 각각의 수율을 비교하였으며, 각 분획물은 hexane 분획물, chloroform 분획물, ethyl acetate 분획물, butanol 분획물 및 물 분획물로 나누어, free radical 소거 활성을 RC₅₀으로 나타내었다. 추출 수율은 종자에서는 추출 온도 78°C, 에탄올 농도 100%에서 11.4%로 다른 온도와 농도 조건에 비하여 높은 수율을 나타냈으며, 과피에서도 역시 추출 온도 78°C, 에탄올 농도

100%에서 44.5%로 다른 온도와 농도 조건에 비하여 높은 수율을 나타냈다. 각 분획물 중에서는 물 분획물이 종자에서는 39.2%인데 비하여 과피에서는 85.6%로 다른 분획물에 비하여 많이 차지하였다. DPPH법에 의한 free radical 소거 활성에서는 종자의 경우, 50°C 에탄올 추출물이 $RC_{50}=16.8 \mu\text{g/mL}$ 로, 분획물에서는 ethyl acetate 분획물이 $RC_{50}=15.4 \mu\text{g/mL}$ 로 가장 높은 활성을 나타내었다. 과피의 경우, 78°C 에탄올 추출물이 $RC_{50}=2437.5 \mu\text{g/mL}$ 로, 분획물에서는 butanol 분획물이 $RC_{50}=698.4 \mu\text{g/mL}$ 로 가장 높은 활성을 나타내었다. 이상의 결과를 통하여 추출 온도와 용매 농도에 따른 수율의 차이가 있었으며 free radical 소거 활성에서는 종자 에탄올 추출물이 과피 에탄올 추출물 보다 145배 이상의 현저히 높은 활성을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 과기처의 지역개발용역사업(강원도 농산자원의 고부가가치 창출을 위한 핵심기술 개발, 과제번호 0101029-1-1(2001213))의 지원으로 수행된 것으로 이에 심심한 사의를 표합니다.

문헌

1. 농촌진흥청. 1993. 품종해설집(원예작물, 버섯류, 잡상).
2. Hur SK, Kim SS, Heo YH, Ahn SM, Lee BG, Lee SK. 2001. Effects of the grapevine shoot extract on free radical scavenging activity and inhibition of pro-inflammatory mediator production. *J Applied Pharmacology* 9: 188-193.
3. Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Tran MX, Stohs SJ. 1997. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract *in vitro*. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 95: 179-189.
4. Singletary KW, Meline B. 2001. Effect of grape seed proanthocyanidins on colon aberrant crypts and breast tumors in a rat dual-organ tumor model. *Nutr Cancer* 39: 252-258.
5. Ray SD, Wong V, Rinkovsky A, Bagchi M, Raje RR, Bagchi D. 2000. Unique organoprotective properties of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cadmium chloride-induced nephrotoxicity, dimethylnitrosamine (DMN)-induced splenotoxicity and mocap-induced neurotoxicity in mice. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 107: 105-128.
6. Joshi SS, Kuszynski CA, Bagchi M, Bagchi D. 2000. Chemopreventive effects of grape seed proanthocyanidin extract on Chang liver cells. *Toxicology* 155: 83-90.
7. Park SY, Kim JW. 1992. Screening and isolation of the anti-tumor agents from medicinal plants (I). *Kor J Pharmacogn* 23: 264-267.
8. Das M, Sur P, Gomes A, Vedasiromoni JR, Ganguly DK. 2002. Inhibition of tumour growth and inflammation by coconsumption of tea. *Phytother Res* 1: 40-44.
9. Lee JH, Lee SR. 1994. Some physiological activity of phenolic substance in plant foods. *Korean J Food Sci Technol* 26: 317-323.
10. Yamaguchi F, Yoshimura Y, Nakazawa H, Ariga T. 1999. Free radical scavenging activity of grape seed extract and antioxidants by electron spin resonance spectrometry in an $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaOH}/\text{DMSO}$ system. *J Agric Food Chem* 47: 2544-2548.
11. Opoku AR, Maseko NF, Terblanche SE. 2002. The *in vitro* antioxidative activity of some traditional Zulu medicinal plants. *Phytother Res* 1: 51-56.
12. Kim SM, Cho YS, Sung SK. 2001. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. *Korean J Food Sci Technol* 33: 626-632.
13. Park SJ, Park BK, Lee HY, Lee, Oh DH. 2002. Screening biological activities of grape seed and skin extracts of campbell early (*Vitis labruscana* B.). *Nutraceuticals and Food* 7: 231-237.
14. Cho SY, Han YB, Shin KH. 2001. Screening for antioxidant activity of edible plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 133-137.
15. Lee MC, Kim GP, Kim SH, Choung NH, Yim MH. 1997. Anti-microbial activity of extract from gall-nut and red-grape husk. *Korean J Food & Nutr* 10: 174-179.
16. Park SJ, Park BK, Lee HY, Lee JH, Kim JD, Oh DH. 2002. Extraction condition and free radical scavenging effect of seed and skin extracts of black olympia grape (*Vitis labruscana* L.). *Korean J Food Preservation* (In press).

(2002년 7월 10일 접수; 2002년 11월 8일 채택)